

В. Ф. Чехун¹, Е. А. Дьоміна¹, М. О. Дружина¹, О. М. Калінкевич², М. О. Жовнер²,
С. О. Вершинський², В. Ю. Сторіжко²

¹ Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. С. Кавецького НАН України, Київ

² Інститут прикладної фізики НАН України, Суми

НОВИЙ ПІДХІД ДО АПРОКСИМАЦІЇ ЗАЛЕЖНОСТІ «ДОЗА - ЕФЕКТ» ПРИ ОПРОМІНЕННІ СОМАТИЧНИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ

Отримано дані стосовно апроксимації експериментальної залежності “доза - ефект” на хромосомному рівні соматичних клітин людини на основі моделі сплайнової регресії, що вдосконалює біодозиметрію опромінення. Це досягається за рахунок зменшення похибки визначення величини поглиненої дози порівняно із традиційним використанням лінійної та лінійно-квадратичної моделі та надає можливість прогнозувати ефект виходу дозових кривих на плато.

Ключові слова: опромінення, лімфоцити, аберації хромосом, сплайнова модель, залежність “доза - ефект”.

Вступ

Серед причин передчасної смерті (зокрема, у осіб репродуктивного віку) найбільш поширеними є онкологічні захворювання. Тенденція до їхнього зростання спостерігається і прогнозується на майбутнє в усіх країнах незалежно від економічного розвитку. Радіаційна онкологія (як один із напрямків ядерної медицини) розробляє і застосовує пріоритетні методи лікування раку. Вона базується на новітніх досягненнях радіаційної фізики, техніки, фундаментальної і клінічної радіобіології. Експерти ВООЗ передбачають, що згодом для значної частини онкологічних хворих необхідною буде точна, сучасна, ефективна променева терапія [1]. Тому одним із найважливіших стратегічних напрямків розвитку сучасної онкології є вдосконалення методів терапевтичного опромінення з метою досягнення повної девіталізації пухлин при збереженні допустимого рівня уражень нормальних клітин [1 - 3].

Сучасний рівень еволюції технічного забезпечення радіаційної онкології характеризується впровадженням у клінічну практику прискорювачів нового покоління, що дає змогу фокусувати пучки іонізуючих випромінювань (ІВ) з точністю до міліметра й опромінювати пухлини в режимі просторово-часової модуляції.

Науковий та практичний інтерес викликає перспектива використання мікропучкових технологій [4, 5] для локального опромінення мікрооб'єктів, що відповідають генетичній структурі клітин. Це дає змогу зробити новий крок на шляху створення високоточної променевої терапії онкологічних хворих, дозиметричного планування та поглибленого дослідження механізмів радіаційного канцерогенезу.

Зауважимо, що проблема біологічної дії різних видів ІВ завжди була предметом досліджень багатьох наукових колективів різних країн. Дослідження виконували на основі врахування специфіки трансформації енергії різних видів ІВ у мікрооб'єктах, а також теоретичних розрахунків рівня радіаційно-індукованих пошкоджень. Виявилось, що вирішити цю проблему тільки з використанням даних мікродозиметрії неможливо. Установлено, що ефективність ІВ визначається не лише їхніми фізичними характеристиками, але й біологічними особливостями опромінених органів, тканин, клітин. При цьому вирішальна роль належить властивості клітин відновлюватися після променевих уражень завдяки роботі систем репарації пошкоджень ДНК [6 - 8].

Для ефективної променевої терапії онкологічних хворих з чітким забезпеченням радіаційного захисту персоналу необхідно знати величину відносної біологічної ефективності (ВБЕ) конкретного джерела ІВ, тому що враховувати її значення, які отримані при застосуванні аналогічних джерел опромінення, можна лише орієнтовно [1, 9, 10]. В Інституті прикладної фізики НАН України створюється експериментальний комплекс на основі мікропучків одиничних іонів та мікропучків квазімонохроматичного рентгенівського випромінювання з використанням електростатичного прискорювача для опромінення біооб'єктів. Це надає можливість проводити дослідження багатьох важливих радіобіологічних ефектів, які неможливо дослідити застосовуючи “тотальне” опромінення зразка. Мікропучки можуть бути використані для селективного опромінення окремих клітин (або модельних об'єктів як субклітинного розміру, так і багатоклітинних), після

чого можна досліджувати зміни, що відбуваються з клітиною та/або з сусідніми неопроміненими клітинами. Також використання мікропучкової технології з достатньою просторовою роздільною здатністю може бути корисним для аналізу взаємодії різних елементарних пошкоджень окремої клітини, динаміки клітинної репарації та внутрішньоклітинних процесів за допомогою високолокалізованого опромінення частин ядра, цитоплазми або мембрани клітин. Основною метою розробки є створення системи для застосування мікропучкової технології у молекулярно-біофізичних та біологічних дослідженнях. Подібних пристроїв у нашій країні немає, а у світі існує небагато [11]. Тому, перш за все, доцільно ретельно дослідити частоту та спектр радіаційно-індукованих пошкоджень у клітинах людини за дії *in vitro* стандартного рентгенівського випромінювання (СРВ) для подальшої порівняльної оцінки біологічної ефективності нового джерела квазімонохроматичного рентгенівського випромінювання та визначення величини ВБЕ.

Оскільки однією з основних мішеней за дії ІВ на людину є генетичний апарат клітин, то його ушкодження свідчать про якісні й кількісні характеристики опромінення [12]. Класичним методом біологічної дозиметрії (індикації) радіаційного впливу на людину вважається аналіз частоти аберацій хромосомного типу в Т-лімфоцитах периферичної крові (ЛПК). Т-лімфоцити – це унікальний за своїми властивостями об'єкт для проведення біодозиметричних досліджень. Основні переваги тест-системи культури ЛПК такі: у периферичній крові лімфоцити не діляться, знаходячись на стадії спокою (G_0), і тому являють собою природно синхронізовану популяцію клітин; незначний і відносно постійний спонтанний рівень хромосомних аберацій у культурі ЛПК і одночасно з цим висока радіочутливість хромосом ЛПК порівняно з хромосомами інших клітин дає змогу достовірно реєструвати підвищення (над спонтанним рівнем) індукованого рівня аберацій; важливою перевагою культури ЛПК є те, що вона дає змогу проводити експериментальні дослідження безпосередньо на клітинах людини, а не вдаватися до вимушеної екстраполяції ефектів з інших модельних об'єктів, що завжди супроводжується певними неточностями; ідентична кількісна залежність утворення аберацій в ЛПК від дози ІВ за умов опромінення клітин *in vitro* і *in vivo* [13]. Усе вищезазначене свідчить про те, що використання тест-системи культури ЛПК людини з метафазним аналізом аберацій хромосом об'єктивізує оцінку біологічної ефективності ІВ різної якості.

Мета роботи: удосконалити апроксимацію за-

лежностей “доза - ефект” за умов опромінення соматичних клітин людини із залученням моделі сплайнової регресії.

Матеріали та методи дослідження

Об'єктом дослідження були ЛПК 10 умовно здорових осіб віком 25 - 40 років, індивідуальна радіочутливість яких за G_2 -radiation sensitivity assay відповідала середньопопуляційним значенням [14]. Культивування ЛПК проводили за модифікованим напівмікрометодом [15] протягом 52 год при температурі 37 °С, що дало змогу аналізувати клітини в першому мітозі після опромінення. Метафазний аналіз рівномірно пофарбованих хромосом виконували з візуальним типовим каріотипуванням. Усього в роботі проаналізовано 13600 метафаз.

Умови опромінення: джерело СРВ – установка РУМ-17; досліджуваний діапазон доз 0,1 - 2,0 Гр при потужності дози 0,41 Гр/хв, сила струму 10 мА, напруга 200 кВ. Дозиметрію здійснювали з використанням іонізаційної камери і феросульфатного дозиметра.

Для апроксимації залежностей кількості радіаційно-індукованих хромосомних аберацій від дози СРВ використовувались математичні моделі лінійної, лінійно-квадратичної та сплайнової регресії.

Результати та обговорення

Дослідження спонтанного рівня аберацій хромосом в ЛПК клінічно здорових осіб показало, що загальна частота пошкоджень знаходилась у межах від 0 до 3,0/100 клітин, що в середньому становило $1,1 \pm 0,3$ аберацій/100 метафаз. Одержане середньогрупове значення не перевищувало середньопопуляційний показник (1,5 %) і було нижчим верхньої межі його норми (3 %) [13]. У спектрі аберацій хромосом в ЛПК обстежених осіб $0,8 \pm 0,1/100$ клітин становили аберації хроматидного типу і $0,3 \pm 0,1/100$ клітин – хромосомного. Індивідуальні розбіжності спонтанного рівня аберацій хромосом формувалися в цілому за рахунок пошкоджень хроматидного типу (делеції), характерних для спонтанного мутагенезу. Одержані результати підтвердили, що ЛПК людини як модель для виконання біодозиметричних досліджень характеризуються низьким рівнем спонтанних аберацій хромосом, що дає змогу об'єктивізувати генетичні ефекти малих доз СРВ.

Аналіз спектра радіаційно-індукованих аберацій хромосом у ЛПК показав, що за дози СРВ 0,1 Гр відношення аберацій хромосомного типу до хроматидного становило 1,0, з підвищенням дози зміщувалося в бік аберацій хромосомного

типу і за дози 1,0 Гр становило 1,6; а 2,0 Гр – 1,86. Відношення аберацій обмінного типу до делецій за дози СРВ 0,1 Гр становило 1,7; а зі збільшенням дози до 1,0 Гр – 2,1. Найбільш наочно ця закономірність простежувалась при аналізі променевиx маркерів – дицентричних хромосом (рисунок), рівень яких у досліджуваному діапазоні доз зростав у 17 разів, тоді як частота вільних парних фрагментів – у 3 рази. Це, у свою чергу, указує на більш інтенсивний темп утворення аберацій обмінного типу з підвищенням променевого навантаження на генетичний апарат соматичних клітин людини.



Дицентрична хромосома разом із супровідним парним фрагментом (указано стрілками).

Зупинимось на методології інтерпретації характеру залежності “доза - ефект”. Найпопулярнішою наразі є лінійно-квадратична модель, що ґрунтується на основі мікродозиметричних концепцій, які Келлерер і Россі сформулювали у відомій теорії дуальної дії [16]. У рамках цієї моделі дозові криві, проміжні між лінійною та квадратичною залежностями (а це більшість дозових кривих, описаних у літературі), пояснюються тим, що енергія, яку поглинають мішені, може бути отримана в результаті як одного, так і двох влучень. У зв’язку з цим дозові криві описують рівнянням $Y = aD + bD^2 + c$ і вважають, що коефіцієнти a і b відображають відносну роль двох механізмів.

Класична інтерпретація утворення аберацій хромосом за дії рідкоіонізуючих випромінювань передбачає лінійну залежність ефекту від дози для однорозривних аберацій (делецій) та квадратичну – для дворозривних (обмінів). Це пов’язують з тим, що аберації обмінного типу є наслідком взаємодії двох первинних уражень, і рівень їх збільшується пропорційно квадрату числа уражень, а кількість делецій відображає частоту первинних уражень. Проте у деяких випадках як лінійні, так і лінійно-квадратичні моделі “доза - ефект” не дають задовільного наближення до

істинних функціональних залежностей [17]. Слід зазначити, що репараційні процеси, які обумовлюють кінцевий радіобіологічний процес, формуються за рахунок компенсаційних можливостей об’єкта. Тому, на наш погляд, для оцінки радіаційно-індукованих цитогенетичних ефектів доцільно використовувати більш динамічні моделі (наприклад, модель сплайнової регресії). Зауважимо, що остаточний вибір математичної моделі з метою біодозиметрії визначається мінімальною величиною її похибки [18].

У нашому дослідженні визначено характер дозових залежностей для різних цитогенетичних показників за дії СРВ на хромосоми Т-лімфоцитів людини із залученням моделі сплайнової регресії (або кусково-лінійних сплайнів) і порівняння запропонованої моделі з лінійною та лінійно-квадратичною. Одержані значення параметрів моделей для різних цитогенетичних показників наведено в таблиці. Аналіз результатів показує, що при СРВ в дослідженому діапазоні доз кусково-лінійні сплайни мають меншу середньоквадратичну похибку порівняно з лінійною і лінійно-квадратичною моделями в усіх випадках.

Загально визнано, що найбільш інформативними біодозиметрами за дії іонізуючої радіації є дицентрики [6, 13, 15, 19]. У нашому дослідженні згідно з лінійно-квадратичною моделлю залежність частоти дицентриків від дози описується функцією $Y = 5,6D + 7,6D^2 - 3,6$. З таблиці випливає, що порівняно з лінійною та лінійно-квадратичною моделями залежність кількості дицентриків від дози найкраще апроксимується кусково-лінійними сплайнами. Наприклад, при визначенні залежності “доза - ефект” для даного цитогенетичного показника похибка лінійної моделі дорівнює 33,1; лінійно-квадратичної – 8,4; сплайнової – 1,6 (тобто в 5 разів менше, ніж для лінійно-квадратичної моделі, та в 20 разів – для лінійної моделі). Таким чином, апроксимація біодозиметричних даних, а саме частоти променевиx маркерів на основі моделі сплайнової регресії приводить до точніших результатів у всіх досліджених випадках. Однак перевага моделі сплайнової регресії не обмежується лише точністю апроксимації експериментальних даних. Ця модель на відміну від інших вищезгаданих дає змогу прогнозувати вихід калібрувальної кривої на плато, яке починається після точки переходу D_0 . Раніше нами було доведено, що межі розташування плато (дозонезалежної ділянки) на калібрувальних кривих залежать від індивідуальної радіаційної чутливості людини [20]. У нашому дослідженні це виразно проявляється для всіх цитогенетичних показників ($D_0 = 0,2 - 0,5$ Гр).

Параметри лінійної, лінійно-квадратичної і сплайнової моделей дозових залежностей цитогенетичних показників при стандартному рентгенівському опроміненні лімфоцитів периферичної крові донорів (*in vitro*)

Цитогенетичні показники	S^2 похибка моделі			Модель лінійної регресії $Y = aD + b$		Модель лінійно-квадратичної регресії $Y = aD + bD^2 + c$			D_0	Модель сплайнової регресії $Y = \begin{cases} a_1D + b_1, \text{ якщо } D \leq D_0 \\ a_2D + b_2, \text{ якщо } D > D_0 \\ a_1D_0 + b_1 = a_2D_0 + b_2 \end{cases}$			
	Л	ЛК	С	a	b	a	b	c		a_1	b_1	a_2	b_2
	1	9,0	8,1	5,5	23,2	-2,2	0,7	20,0		0,76	0,5	8,7	2,2
2	2,7	3,7	1,2	56,9	-2,4	13,9	1,6	2,5	0,2	2,7	-2,9	88,1	-12,0
3	8,5	5,1	3,2	1,2	0,4	12,4	5,0	2,7	0,2	-9,7	1,4	2,6	-4,0
4	2,2	2,6	1,2	54,5	-23,0	12,4	5,0	2,7	0,2	28,4	-5,0	8,2	-11,2
5	1,3	1,9	0,1	12,7	-8,9	3,9	-4,8	4,2	0,3	8,2	-3,3	2,7	-5,7
6	33,1	8,4	1,6	32,9	-22,4	5,6	7,6	-3,6	0,25	18,6	-7,3	4,6	-5,7

Примітка. 1 – кількість аберантних метафаз, %; 2 – загальна кількість абераций хромосом, %; 3 – загальна кількість абераций хроматидного типу, %; 4 – загальна кількість хромосомних абераций, %; 5 – кількість фрагментів, %; 6 – кількість дицентриків, %; Л – похибка моделі лінійної регресії; ЛК – похибка моделі лінійно-квадратичної регресії; С – похибка сплайнової моделі; a , b , c – коефіцієнти (параметри) лінійної і лінійно-квадратичної регресії; a_1 , b_1 , a_2 , b_2 – коефіцієнти (параметри) сплайнової регресії; D – доза опромінення, D_0 – точка переходу; Y – частота абераций на 100 метафаз.

Висновки

Використання методу апроксимації експериментальних даних “доза - ефект” на основі моделі сплайнової регресії удосконалює біодозиметрію опромінення: зменшує похибку визначення величини поглиненої дози порівняно із використанням традиційних лінійної та лінійно-квадратичної моделей та надає можливість прогнозувати ефект виходу дозових кривих для різних цитогенетичних показників на плато.

Одержані дані є підґрунтям для подальшого дослідження відносної біологічної ефективності нових джерел іонізуючих випромінювань з різними фізико-дозиметричними характеристиками.

Роботу виконано за фінансової підтримки УНТЦ (проект № 5728 “Розроблення іонних та рентгенівських мікропучків з використанням електростатичних прискорювачів та дослідження радіаційних пошкоджень клітин”).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Иванкова В.С., Дёмина Э.А.* Проблемы резистентности опухолей в радиационной онкологии. - К.: Здоров'я, 2012. - 192 с.
2. *Лучевая терапия в лечении рака: практическое руководство.* - Лондон; Вайнхайм; Токио, 2000. - 338 с.
3. *Дьоміна Е.А.* Радиобіологічні та клінічні аспекти нейтронів // Укр. радіол. журнал. - 2010. - Т. 18, вип. 2. - С. 175 - 178.
4. *Kelly Y.K.* Nanotechnology platforms and physiological challenges for cancer therapeutics // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* - 2007. - No. 3. - P. 103 - 110.
5. *Bigelow A.W., Ross G.I., Randers-Pehrson G. et al.* The Columbia University microbeam II endstation for cell imaging and irradiation // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms.* - 2005. - Vol. 231. - P. 202 - 206.
6. *Гродзинський Д.М.* Радиобіологія. - К.: Либідь, 2000. - 448 с.
7. *Гриневиц Ю.А., Дёмина С.А.* Иммуные и цитогенетические эффекты плотно- и редкоизирующих излучений. - К.: Здоров'я, 2006. - 200 с.
8. *Little J.B.* Radiation carcinogenesis // *Carcinogenesis.* - 2000. - Vol. 21, No. 3. - P. 397 - 404.
9. *Магдон Е.* Относительная биологическая эффективность нейтронов с энергией 6,2 МэВ // *Мед. радиология.* - 1977. - № 10. - С. 40 - 42.
10. *Djomiina E.* Biologic dosimetry for large-field technique in oncologic patient radiotherapy: ESTRO23 (Amsterdam, Oct. 24 - 28, 2004) // *Radiotherapy Oncology.* - 2004. - Vol. 73. - P. 449.
11. *Harken A.D., Randers-Pehrson G., Johnson G.W., Brenner D.J.* The Columbia University proton-induced soft X-ray microbeam // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B.* - 2011. - Vol. 269. - P. 1992 - 1996.
12. *Биологический контроль окружающей среды /* Под ред. С.А. Гераськина и Е.И. Сарapultцевой. - М.: Академия, 2010. - 208 с.
13. *Дёмина Э.А., Пилинская М.А., Петунин Ю.И., Ключин Д.А.* Радиационная цитогенетика. - К.: Здоров'я, 2009. - 368 с.
14. *Дьоміна Е.А., Рябченко Н.М., Дружина М.О., Чехун В.Ф.* Цитогенетичний спосіб (G2-assay) визначення

- індивідуальної радіочутливості людини з метою первинної профілактики радіогенного раку: Методичні рекомендації. - К.: МОЗ України, 2007. - 28 с.
15. *Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies.* - Vienna: IAEA, 2011. - 232 p.
 16. *Kellerer A.M., Rossi H.H.* The theory of dual radiation action // *Curr. Top. Radiat. Res. Quart.* - 1972. - Vol. 8. - P. 85 - 158.
 17. *Сёмов А.Б., Иофа Э.П., Акаева Э.А., Шевченко В.А.* Дозовая зависимость индукции хромосомных aberrаций ликвидаторов Чернобыльской аварии // *Радиационная биология. Радиоэкология.* - 1994. - № 6. - С. 865 - 870.
 18. *Клюшин Д.А., Петунин Ю.И.* Доказательная медицина. - Москва - Санкт-Петербург - Киев: Диалектика, 2008. - 316 с.
 19. *Макконки Э.* Геном человека. - М.: Техносфера, 2008. - 288 с.
 20. *Дьоміна Е.А. Демченко О.М. Михайленко В.М. та ін.* Модель сплайнової регресії і урахування індивідуальної радіаційної чутливості людини для реконструкції дози опромінення по хромосомних aberrациях // Патент № 46033. - Держ. департамент інтелект. власності, 2010.

**В. Ф. Чехун, Э. А. Дёмина, Н. А. Дружина, А. Н. Калинин,
М. А. Жовнер, С. А. Вершинский, В. Е. Сторижко**

НОВЫЙ ПОДХОД К АППРОКСИМАЦИИ ЗАВИСИМОСТИ «ДОЗА - ЭФФЕКТ» ПРИ ОБЛУЧЕНИИ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Получены данные относительно аппроксимации экспериментальной зависимости "доза - эффект" на хромосомном уровне соматических клеток человека на основе модели сплайновой регрессии, применение которой усовершенствует биодозиметрию облучения. Это достигается за счет уменьшения ошибки определения величины поглощенной дозы по сравнению с традиционным использованием линейной и линейно-квадратической модели и дает возможность прогнозировать эффект выхода дозовых кривых на плато.

Ключевые слова: облучение, лимфоциты, aberrации хромосом, сплайновая модель, зависимость "доза - эффект".

**V. F. Chekhun, E. A. Dyomina, M. O. Druzhyna, A. N. Kalinkevich,
M. O. Zhovner, S. O. Vershynsky, V. Yu. Storizhko**

NEW APPROACH TO THE APPROXIMATION OF "DOSE - EFFECT" DEPENDENCE DURING THE HUMAN SOMATIC CELLS IRRADIATION

New data on cytogenetic approximation of the experimental cytogenetic dependence "dose - effect" based on the spline regression model that improves biological dosimetry of human radiological exposure were received. This is achieved by reducing the error of the determination of absorbed dose as compared to the traditional use of linear and linear-quadratic models and makes it possible to predict the effect of dose curves on plateau.

Keywords: irradiation, lymphocyte, chromosome aberration, spline model, "dose - effect" dependence.

Надійшла 05.06.2013
Received 05.06.2013